Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

ZUR WIRKUNG DER 1-AMINOADAMANTANE - EINFLUSS AUF DIE MONOAMINOXIDASE AKTIVITÄT VON HIRN, LEBER UND NIERE DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

OKECHUKWU EKENNA
aus Aba/Mbaise - Nigeria

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

ZUR WIRKUNG DER 1-AMINOADAMANTANE - EINFLUSS AUF DIE MONOAMINOXIDASE AKTIVITÄT VON HIRN, LEBER UND NIERE DER RATTE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

OKECHUKWU EKENNA
aus Aba/Mbaise - Nigeria

Marburg 1979

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 29. Juni 1979

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. W. Wesemann

Correferent: Prof. Dr. H. Oepen

Tabelle der Abkürzungen

DA	Dopamin
D1	Amantadin = Symmetrel^{R}= 1-Aminoadamantan.HCl
D145	Memantin = DMAA(Dimethyladamantanamin) = 1-Amino-3,5-dimethyladamantan.HCl
D178	1-Amino-3-(n)-butyladamantan.HCl
D191	1-Amino-3,5,7-trimethyladamantan.HCl
FG	Feuchtgewicht
$K_D = K_I$ =	Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat- bzw. des Enzym-Inhibitor-Komplexes
K_M	Michaeliskonstante
MAO	Monoaminoxidase
MG	Molekulargewicht
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ZNS	Zentralnervensystem
5-HIAA	5-Hydroxyindolacetic acid (5-OH-Indolazetat)
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0003

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung 1

B. Material und Methoden: 8

1) Versuchstiere und Präparation der Organe 8

2) Chemikalien 8

3) Puffer 10

4) Proteinbestimmung: 10

a) Prinzip 10

b) Reagenzlösungen 10

c) Durchführung 11

5) Bestimmung der MAO-Aktivität: 12

a) Prinzip 12

b) Homogenisieren der Organe 13

c) Versuchsansatz 14

d) Auswertung 15

6) Radioaktivitätsmessung 16

C. Ergebnisse: 17

1) Proteinkonzentration der Organe 17

2) Proteinabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit 17

3) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration 17

4) Vergleich der MAO-Aktivität in den verschiedenen Organen 18

5) Hemmwirkung der 1-Aminoadamantane: 23

a) Typ der Hemmung 23

b) Vergleich der Hemmstoffwirkung in den einzelnen Organen 24

c) Vergleich der Hemmstoffe untereinander 25

D. Diskussion: 33

1) Versuchstiere 33

2) Proteinbestimmung 33

3) Zur Kinetik und Hemmung der MAO 33

3.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substrat- und Proteinkonzentration 33

3.2. MAO-Aktivitäten der Organe 34

4) Hemmung: 37

a) Hemmtyp 37

b) Hemmwirkung in den einzelnen Organen 37

c) Vergleich der Hemmstoffe untereinander 37

d) Struktur der 1-Aminoadamantane und die Hemmwirkung 38

E. Zusammenfassung 41

F. Summary 42

G. Literaturverzeichnis 43

A. EINLEITUNG

Endogene Amine wie Katecholamine und Indolalkylamine werden u.a. durch den katalytischen Einfluß der Monoaminoxidase [MAO: Amine: O_2-Oxidoreductase (deaminating) enzymes (E C. 1. 4. 3. 4.)] umgesetzt: $R - CH_2 - NH_2 + H_2O + O_2 \rightarrow RCHO + NH_3 + H_2O_2$.
Zahlreiche Versuche haben ergeben, daß es mit hoher Wahrscheinlichkeit multiple Formen der MAO gibt [1,2,3]. Selektive Hemmung [4] und Substratspezifität [5] haben zu der Annahme einer "A" und "B" Form geführt. So sollen z. B. sympathische Nervenfasern hauptsächlich MAO Typ "A" enthalten, während der Typ "B" die wichtigste Form dieses Enzyms in der Zirbeldrüse (glandula pinealis) ist [6].Das Verhältnis A/B variiert von Organ zu Organ [4].
YOUDIM et al. [7] haben in der Rattenleber mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese 5 verschiedene Molekularformen der MAO nachweisen können, was die Annahme unterstreicht, daß Typ "A" und Typ "B" keine homogene Formen darstellen.
Ungeachtet der Kritik, daß die Isoenzyme der MAO Artefarkte sind, die bei der Gewinnung des reinen Enzyms entstehen können [8,9], gilt es jetzt als gesichert, daß auch in vivo das Enzym MAO nicht in homogener Form vorkommt [1,2].

Die MAO ist in der Außenmembran des Mitochondrions lokalisiert [10]. Nach YOUDIM [11] soll lösliche, hochgereinigte MAO neben dem Proteinanteil mit SH- Gruppen als Cofaktor Flavin und Eisen enthalten. Für die Integrität des Enzyms sollen Phospholipide entscheidend sein.
Die von YOUDIM et al. [7] gefundenen Molekulargewichte der 5 Formen in der Leber variieren zwischen 290 000 und 320 000.

Die Steroide haben einen physiologischen Einfluß auf MAO. Progesteron erhöht, Östrogen erniedrigt die MAO-Aktivität in Hypothalamus und Uterus von der Ratte [13,14].
Thyroidektomie bei Kaninchen und Ratte erhöht die MAO-Aktivität in der Leber, während die Aktivität in der Niere erniedrigt wird [1]. Insulin hat ebenfalls einen die Aktivität der MAO steigernden Einfluß [12,16].
Nach NEFF und GORIDIS [6] soll MAO in den Nervenendigungen die folgende Funktion haben: Aufrechterhaltung der für eine optimale Funktion der Neurone notwendigen zytoplasmatischen Konzentration der Monoamine. Die Abwesenheit von MAO bedeutet: 1) Die Ansammlung von Katecholaminen und 5-HT in den Neuronen; 2) eine Abnahme der Katecholaminsynthese - vermutlich durch negative Rückkopplung und 3) die Ansammlung und Freisetzung von falschen Transmittern.
MAO soll auch für den Foetus eine wichtige Rolle spielen [15]. Nach KOREN produziert die Plazenta MAO, die in der Amnionflüssigkeit den Foetus gegen vassopressive Amine der Mutter schützt [15].

Bedeutung und Biosynthese des Serotonins:

Eines der Substrate der MAO ist Serotonin (5-HT). Das 5-HT kommt in zahlreichen Organen der Säugetiere vor [17]. Die Konzentration ist hoch in den Blutplättchen, den enterochromaffinen Zellen und dem Plexus myentericus des Verdauungstraktes. Im Gehirn findet man geringere Mengen.
In einer Zusammenfassung [42] werden ausführliche Angaben über die Konzentration von Serotonin in verschiedenen Körperteilen

des Menschen gemacht. Hier einige ausgesuchte Werte:

Thrombozyten: 0.65 ± 0.06 µg/10^9 Plättchen (fluorimetr. Best.).

Blut: 0.19 ± 0.02 µg/ml. (" ")

Serum: 0.21 ± 0.008 µg/ml. (" ")

Z N S:

Corpus Striatum(speziell Putamen): 0.57µg/g (Costa & Aprison Bioassay).

Thalamus: 0.73µg/g (")

Hypothalamus: 0.83µg/g (")

Subst. nigra: 1.42µg/g (")

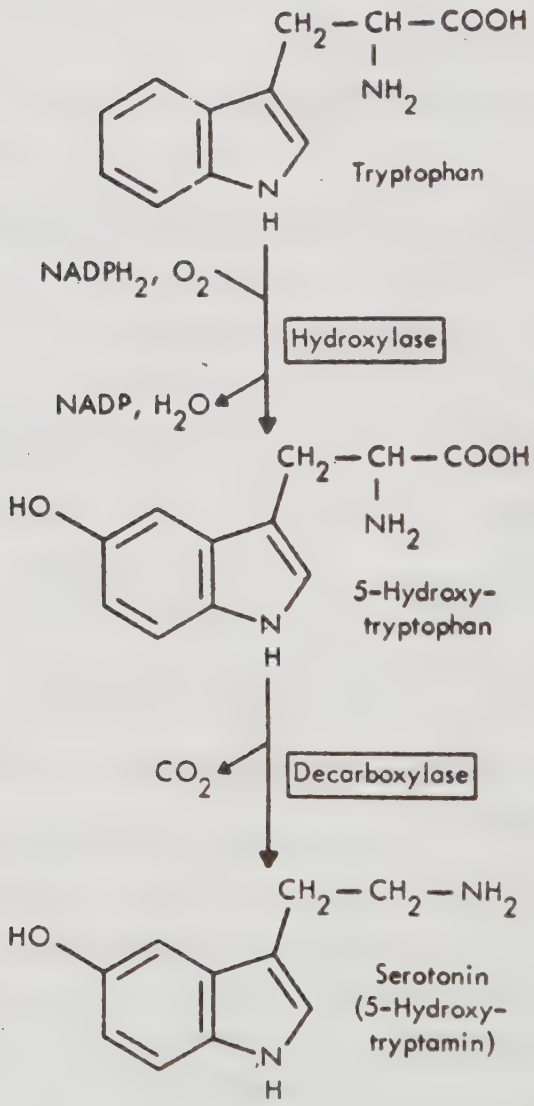
Liquor: 0.001µg/g (Ashcroft & Sharman fluorimetr.).

VERDAUUNGSTRAKT:

Corpus ventriculi	0.7 - 3.5	µg/g	Mukosa
Duodenum	4.8 - 7.8	"	"
Colon	3.3 - 8.6	"	"
Appendix	1.1	"	"

5-HT entsteht im Körper durch Hydroxylierung und Decarboxylierung von Tryptophan:

Biosynthese des Serotonins [45]:



Das 5-HT spielt als gefäßverengende Substanz eine Rolle bei der Erhöhung des Blutdrucks und wird im Schock zusammen mit Histamin ausgeschüttet.
Von den Raphekernen des Hirnstammes, die serotonerge Neuronen enthalten, gehen efferente Fasern zu Teilen des Hypothalamus, des limbischen Systems und des Neocortex.

Zur Pathochemie der Monoamine im Z N S.
Die Transmitterfunktion der Monoamine ist bei zahlreichen hirnorganischen und psychotischen Störungen verändert [1,18]. Bei der idiopathischen Parkinson-Erkrankungfindet man eine Degeneration von Melanin pigmentierten Neuronen im Stammhirn [19]. Die GewebSspiegel an Dopamin, das von diesen Zellen produziert wird, sind erniedrigt.
Während auch bei manchen anderen Erkrankungen des Extrapyramidalsystems die Symptome Akinese und Rigor beobachtet wurden, findet man nur beim M. Parkinson (paralysis agitans) eine selektive Degeneration der DA-bildenden Zellen [19].
Nach HORNYKIEWICZ ist bei M. Parkinson auch der 5-HT Gehalt des ZNS erniedrigt [41].
Die Anticholinergika waren die Therapie der Wahl in der Behandlung des M. Parkinson, bis man die Wichtigkeit des DA-mangels erkannte [19]. Seitdem versucht man durch Gabe der Vorstufe L-Dopa, das im Gegensatz zum DA die Bluthirnschranke passiert, zentral DA zu substituieren. Durch Erhöhung der DA-Spiegel im Hirn wird bei zahlreichen Parkinsonpatienten auch eine Besserung des Symptoms der Akinese erreicht, die mit Anticholinergica nicht zu behandeln ist.
1-Aminoadamantan (Amantadin, D1) erhöht wie eine Reihe von

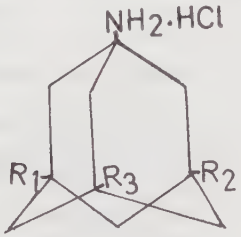
indirekt wirkenden Sympathomimetika, z.B. Amphetamin, die Katecholaminausschüttung aus den Nervenendigungen des ZNS und hemmt die Wiederaufnahme [19]. Dl steigert den Katecholaminmetabolismus und bewirkt dadurch die Zunahme der DA-Ausschüttung aus Katecholaminneuronen nach Nervenreizung [19]. Dies ist wahrscheinlich die Erklärung für den Antiparkinsoneffekt dieser Substanz, die zunächst beim Menschen zur Prävention und Behandlung der Influenza A_2 Virus-Infektion eingesetzt wurde [19].

Seit der Einführung von Dl in die Therapie des M. Parkinson sind zahlreiche Derivate, hauptsächlich durch N-Substitution, synthetisiert worden. Sie konnten aber meist wegen zu starker Nebenwirkungen wie z.B. psychotische Episoden, Halluzinationen, Dyskinesen und Trockenheit im Mund nicht in der Klinik routinemäßig eingesetzt werden [19,39].

Problemstellung.

Im Stoffwechsel der Katecholamine und des 5-HT kommt der MAO eine besondere Bedeutung zu. Da bei M. Parkinson einerseits die Konzentrationen von DA und 5-HT erniedrigt sind und andererseits 1-Aminoadamantan die Symptomatik bei dieser extrapyramidalen Störung verbessert, soll in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von 1-Aminoadamantan und einigen C-Alkylderivaten auf die Wirkung der MAO-Aktivität des Rattenhirns in vitro untersucht und mit dem Einfluß dieser Substanzen auf die Enzymaktivitäten von Leber und Niere verglichen werden.

Die folgenden Adamantane wurden in die Untersuchungen einbezogen:



i) Dl = 1-Aminoadamantan.HCl

$R_1 = R_2 = R_3 = H$

ii) Dl45 = 1-Amino-3,5-dimethyladamantan.HCl

$R_1 = R_2 = -CH_3$; $R_3 = H$

iii) Dl91 = 1-Amino-3,5,7-trimethyladamantan.HCl

$R_1 = R_2 = R_3 = -CH_3$

iv) Dl78 = 1-Amino-3-(n)-butyladamantan.HCl

$R_1 = R_3 = H$; $R_2 = -(CH_2)_3-CH_3$

Die Wirkung von Dl ist klinisch gesichert, Dl45 ist noch in der klinischen Erprobung. Die anderen beiden Substanzen - Dl91 und Dl78 sind in der medizinischen Literatur unbekannt.

In einer Arbeit über die Wirkungsweise der 1-Aminoadamantane [20] konnten HAACKE et al. zeigen, daß 5-HT und DA aus isolierten Nervenendigungen sowohl durch Reizung mit Stromimpulsen als auch durch Dl und Dl45 freigesetzt werden, und, daß auch die Wiederaufnahme des 5-HT durch beide Substanzen nicht-kompetitiv gehemmt wird.

Aufgrund von Versuchen mit isolierten synaptischen Strukturen - Vesikel, Membranen und Nervenendigungen - erklären die Autoren die Wirkung der 1-Aminoadamantane mit einem Modell, das die Anreicherung von biogenen Aminen (5-HT und DA) im synaptischen Spalt vorsieht [20]. Die Anreicherung der Amine im synaptischen Spalt soll nach dieser Hypothese durch folgende Wirkungen der 1-Aminoadamantane hervorgerufen werden:

1) Hemmung der Speicherung der biogenen Amine in den Vesikeln;

2) Hemmung der Bindung der biogenen Amine an die synaptischen Membranen;
3) Hemmung der Rückresorption der biogenen Amine in die Nervenendigungen;
4) Verstärkung der Transmitterausschüttung bei Reizung;
5) Erhöhung der Aminkonzentration durch Hemmung der MAO.

Die letzte Hypothese, die auf Arbeiten [38] über die Wirkung des 1-Aminoadamantan im ZNS basiert, ist Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit, in der der Einfluß von 1-Aminoadamantan und 3 C-Alkylderivaten dieser Substanz auf die MAO von Hirn, Leber und Niere der Ratte überprüft werden soll.
Als Substrat der MAO wird ausschließlich 5-HT verwandt.

B. MATERIAL UND METHODEN

1) Versuchstiere und Präparation der Organe.

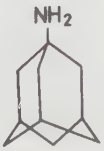
Männliche Wistar II Ratten, im Gewicht von 200 - 260g, Futter (Altromin) und Wasser ad libitum, wurden zwischen 8 Uhr und 10 Uhr durch einen kräftigen Schlag in das Genick getötet. Der Kopf wurde sofort mit einer Schere abgetrennt. Die Organe - Hirn, Leber und Niere - wurden rasch entnommen, in eiskalte Pufferlösung zur MAO-Bestimmung gelegt und weitgehend von oberflächlich anhaftendem Blut befreit.
Vor dem Homogenisieren wurde jedes Organ bzw. Organstück kurz mit Filterpapier abgetrocknet, gewogen und mit dem entsprechenden Volumen des MAO-Puffers versetzt.

2) Chemikalien

a) Serotonin (5-HT) = 5-Hydroxytryptamin - (Seitenketten 2[^{14}C])-kreatininsulfat [Amersham Buchler, Braunschweig], spezifische Aktivität 54mCi/mMol bzw. 58mCi/mMol
wurde mit dem MAO-Puffer verdünnt, die erhaltenen Stammlösungen (ca. 8.0 - 0.8 x 10^{-5}M) wurden in Portionen von ca 1 ml. eingefroren und erst unmittelbar vor einem Versuch aufgetaut.

b) 1-Aminoadamantane [Hemmstoffe von Merz & Co., Frankfurt/M]

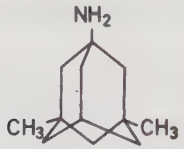
D1 = 1-Aminoadamantan. HCl
($C_{10}H_{15}NH_2$.HCl) MG. = 187.58



D1

ii) D145 = 1-Amino-3,5-dimethyladamantan.HCl

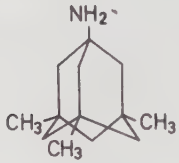
($C_{12}H_{19}NH_2$.HCl) MG. = 215.76



D 145

iii) D191 = 1-Amino-3,5,7-trimethyladamantan.HCl

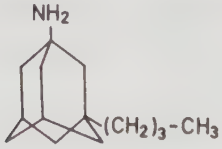
($C_{13}H_{21}NH_2$.HCl) MG. = 229.78



D191

iv) D178 = 1-Amino-3-(n)-butyladamantan.HCl

($C_{14}H_{23}NH_2$.HCl) MG. = 243.81



D178

c) Salzsäure:

i) 3.0 N HCl

ii) 0.3 N HCl

d) Äthylacetat
e) Methanol } wurden im Labor redestilliert.

f) Szintillationslösung:

5.5g Permablend [bestehend aus 91% =5g PPO und 9% =0.5g bis-MSB] wurden in 1 L Toluol für die Szintillationsmessung [Merck, Darmstadt] gelöst.

PPO = 2,5-Diphenyloxazol

bis-MSB = p-bis-(o-Methylstyryl)-benzol

3) Phosphatpuffer zur Bestimmung der MAO-Aktivität.

Lösung A: KH_2PO_4 0.2M = 2.7218g/100ml

Lösung B: NaOH 0.2M = 0.8008g/100ml

Phosphatpuffer pH 8.3: 50ml Lösung A
+ 35ml Lösung B
+ 15ml aqua bidest

4) Proteinbestimmung.

Prinzip: Die Methode nach LOWRY et al. [28] vereinigt die Biuretreaktion - Komplexbildung eines Cu^{++} mit 4 Peptid-N-Atomen [Violettfärbung in Alkali] - mit dem Tyrosin- und Tryptophannachweis durch das Folinreagenz.

b) Reagenzlösungen:

1) Lösung A: 20g Na_2CO_3
4g NaOH
0.238g di Na-tartrat-H_2O werden in 1 L Wasser gelöst.

ii) Lösung B: 0.50g $CuSO_4.H_2O$ werden in 100ml Wasser gelöst.

iii) Lösung C: 1.0 ml Lösung B in 50ml Lösung A gelöst.

iv) Lösung D: Zu 15ml Folin-Ciocalteau-Phenol Reagenz werden 21ml H_2O gegeben.

c) Durchführung.

Lösungen C & D werden erst unmittelbar vor der Messung angesetzt.

Zu 10µl verdünntem Organhomogenat [Proteingehalt von ca. 50µg bis 90µg] werden 5ml Lösung C gegeben. Die gut gemischte Lösung [Whirlmix] bleibt mindestens 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor unter kräftigem Schütteln 0.5ml Lösung D hinzugegeben werden.

Nach frühestens 30 Minuten beginnt man mit der Messung. Die Farbe ist jedoch nur ca. 3 Stunden stabil.

Die Blindprobe enthält nur die Lösungen C und D.

Zur Aufstellung der Eichkurve wird Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 10µg bis 100µg/ml verwandt. Hierzu wurde 0.1 bis 1.0ml einer Stammlösung von Rinderserumalbumin, die 100µg/ml enthält, mit 0.9 - 0.0ml aqua bidest verdünnt. Je 1ml der Verdünnungsreihe wurde mit 5.0ml Lösung C versetzt, sofort kräftig gemischt und, wie oben für das Organhomogenat beschrieben, weiter verfahren.

Alle Bestimmungen werden in Glasküvetten durchgeführt, die zuvor gegeneinander vermessen werden. Die Messung erfolgt mit dem Zeiss Spektrophotometer PMQ II bei 660nm und 4-facher Verstärkung.

Der Verlauf einer Eichkurve zur Proteinbestimmung ist in Abb. 1 dargestellt.

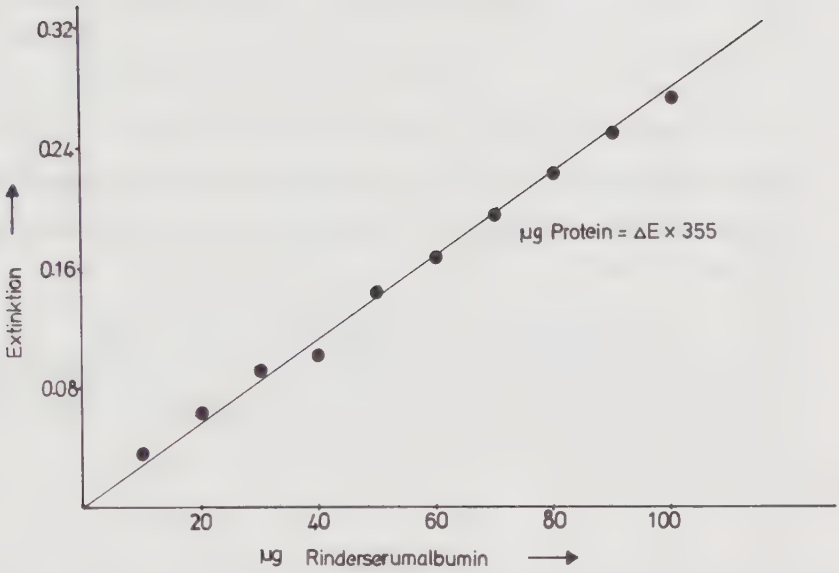


Abb. 1: Eichkurve zur Proteinbestimmung.

1ml einer Lösung von Rinderserumalbumin wurde nach der Methode von LOWRY [28] umgesetzt und die Extinktion bei 660nm bestimmt.

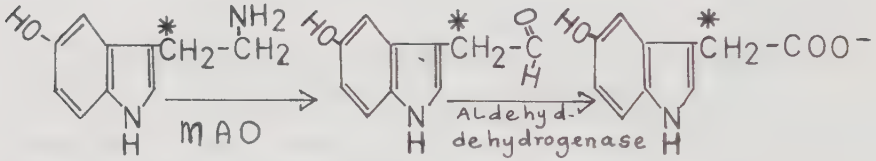
5) Bestimmung der MAO-Aktivität.

a) Prinzip:

Es wurde die von McCAMAN et al. [29] beschriebener Methode angewandt. Die Monoaminoxidase, die in dem Organhomogenat enthalten ist, katalysiert den Abbau des Serotonin (5-HT) zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd. Die Aldehyddehydrogenase der

Organextrakte setzt den Aldehyd weiter zu 5-Hydroxyindolacetat (5HIAA) um, so daß nach Inkubation von 5-HT mit dem Homogenat Säure und Aldehyd in etwa gleichen Mengen nachzuweisen sind.

Bei Verwendung eines in C_2-Stellung der Seitenkette radioaktiv markierten Serotonins sind auch die beiden Abbauprodukte, 5-Hydroxyindolacetaldehyd und 5-Hydroxyindolessigsäure (5HIAA) markiert.



Nach Abtrennung dieser Abbauprodukte vom eingesetzten Substrat, Serotonin, durch Extraktion in Äthylacetat kann durch Bestimmung der Radioaktivität in der Äthylacetatphase auf die Menge an 5-Hydroxyindolacetaldehyd und 5HIAA, und damit auf die Aktivität der MAO geschlossen werden.

Durch Extraktion mit Äthylacetat können die Abbauprodukte von dem in der salzsauren, wässrigen Phase verbliebenen 5-HT abgetrennt werden. Nach Messung der Radioaktivität in der Äthylacetatphase kann anschließend die Menge an gebildeten 5-Hydroxyindolacetaldehyd und 5HIAA und damit die Aktivität der MAO berechnet werden.

b) Homogenisieren der Organe.

Pro Gramm Feuchtgewicht (FG) wurde 25ml Phosphat-Puffer zugegeben.

Es wurde festgestellt, daß Pottern allein ohne vorheriges Zerkleinern des Organs - besonders für die Leber und Niere - nicht genügte, um ein ausreichendes Homogenisieren des Organs zu erreichen. Deshalb wurden alle Organe vor dem Pottern mit Hilfe des Ultra-turrax (Typ TP 18/2, Janke & Kunkel KG Staufen i. Br.) in Polyäthylenzentrifugenröhrchen (ca. 30ml) während 3 mal 15 sec. (mit 2 mal 15 sec. Zwischenpausen) zerkleinert. Für Leber und Hirn erfolgte dies auf Stufe 70, für die härtere Niere auf Stufe 125. Organ und Puffer wurden ständig im Eisbad gekült. Das Homogenat wurde dann sofort (nach dem letzten Homogenisieren) in das Pottergefäß überführt.

Pottern (Organ weiterhin gekühlt):

Das Pottern erfolgte nach dem Schema:

i) 2 Min. Stufe 4
5 Min. Pause

ii) 2 Min. Stufe 4
5 Min. Pause

iii) 2 Min. Stufe 4

Zum Pottern wurde ein Rührmotor (Typ E 60 Heidolph Elektro KG), Stufe 4 entsprechend 1000U/Min. verwandt.
Das Pottern erfolgte durch Auf- und Abbewegen des Stempels in dem Pottergefäß. In 2 Minuten 8 mal Auf- und Abbewegung.

c) Versuchsansatz.

Aus dem frisch suspendierten Homogenat wurden in der Kälte pro Versuchsansatz je 10µl entnommen und in die Inkubationsgefäße (Glasschliffröhrchen - Außen Ø 1.2cm, Innen Ø 0.8cm, Höhe 5cm, Gesamtinhalt ca. 1.1ml) pipettiert.

Zur Bestimmung der MAO-Aktivität wurden 100µl einer 0.57 - 4.62 x 10^{-5}M [^{14}C] 5-HT Lösung in Phosphatpuffer (Endkonz. in den 110µl Inkubationslösung ca. 0.52 - 4.20 x 10^{-5}M) hinzugegeben und 30 Min. bei 37.5°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert.

Bei den Hemmversuchen zur Ermittlung des Hemmtyps nach LINEWEAVER - BURK wurden 10µl Homogenat zunächst mit 50µl einer Lösung des Hemmstoffes (ca. 2.2 x 10^{-3}M) im Phosphatpuffer im Kühlraum mindestens 15 Minuten vorinkubiert, bevor die Reaktion mit 50µl 1.04 - 9.24 x 10^{-5}M [^{14}C] 5-HT Lösung (Endkonz. der Hemmstoffe in den 110µl ca. 10^{-3}M) bei 37.5°C gestartet wurde.

Für die Bestimmung des K_I-Wertes nach DIXON wurden Hemmstoffkonz. zwischen 0.013 - 2 x 10^{-3}M verwandt.

Die Reaktion wurde nach 30 Min. Inkubation mit der Zugabe von 10µl 3.0N HCl (kräftig mischen!) gestoppt.

Nach Extraktion mit je 500µl Äthylacetat wurde 5 Min. in einer Tischzentrifuge, MSE Super Minor Centrifuge, bei ca. 4500U/min zentrifugiert. Je 400µl der Äthylacetatphase wurden in einem Eppendorfreaktionsgefäß, Volumen ca. 1.5ml, mit 300µl 0.3N HCl gemischt und anschließend 2 Min. in einer Eppendorftischzentrifuge [Typ 3200] bei 15000U/Min, 12000g zentrifugiert. Von der überstehenden Äthylacetatphase wurden je 40µl zur Radioaktivitätsmessung eingesetzt; für jede Konzentration wurden 4 Bestimmungsansätze inkubiert.

d) Auswertung.

Umsatz pro mg Protein des Homogenates pro 60 Min:

2.5 x A/B x 10^3 ZpM = 2.5 x A/B x 4.5045/S x 10^{-10} Mol

A = ZpM (Zerfälle pro Minute) in 40µl Äthylacetatphase minus Blankowert.

B = mg Protein pro ml Homogenat

S = spezifische Aktivität des 5-HT [mCi/mMol]

6) Radioaktivitätsmessung.

Zur Radioaktivitätsmessung mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillation wurden je 40µl der Äthylacetatphase mit 1ml Methanol und 5ml Toluolszintillatorcocktail versetzt.
Vergleichsmessungen unter Verwendung von 15ml Toluolcocktail hatten ergeben, daß durch die Reduktion auf 5ml die Zählausbeute nicht beeinflußt wurde. Die Proben wurden im Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer Model 3380/544 mit externer Korrektur des Löscheffektes gemessen.

C. ERGEBNISSE

1) Proteinkonzentration der Organe.

Wie Tabelle I zeigt, unterscheiden sich die Organe in ihren Proteingehalt hochsignifikant. Die gefundenen Werte stimmen gut überein mit den für den Menschen angegebenen Proteingehalt (Bartley, Birt und Banks[40]) umgerechnet in mg Protein/g Feuchtgewicht.

Zur Signifikanzberechnung wurde der Student(t-) Test für homogene Varianzen durchgeführt. Der Vergleich der Werte von Niere mit Hirn bzw. Hirn mit Leber ergab ein $\alpha < 0.1\%$; der Vergleich Niere mit Leber ergab ein $\alpha = 0.1\%$; d.h. die Unterschiede sind hochsignifikant.

Der Leber mit den höchsten Gehalt an Protein folgen Niere und Hirn.

2) Proteinabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit.

Aus der graphischen Darstellung der Abb. 2 geht hervor, daß in dem untersuchten Konzentrationsbereich bei allen Organen ein linearer Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit (MAO-Aktivität) besteht.

3) Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist bei konstanter Enzymkonzentration der Substratkonzentration direkt proportional [Abb. 3]. Die Linearität wurde für den Konzentrationsbereich von 0.2 - 4.0 x 10^{-5}M 5-HT (Endkonz. im Inkubationsansatz von 110µl) für alle 3 Organe überprüft.

Tabelle I: Proteinkonzentration der Organe(Methode n. LOWRY[28]):

Organ	n	PROTEINGEHALT		
		mg Protein/ml Homogenat	mg/g Feuchtgew.	mg/g Feuchtgew.*
Niere	8	7.74 ± 0.36	0.192	0.172
Hirn	12	5.05 ± 0.32	0.126	0.100
Leber	11	8.64 ± 0.55	0.216	0.219

Jede Probe wurde 3-fach bestimmt.
Angegeben sind die Mittelwerte von n-Bestimmungen und die Standardabweichungen.
* = Angaben nach Bartley, Birt und Banks[40] für Mensch, umgerechnet auf mg Protein/g Feuchtgewicht.

4) Vergleich der MAO-Aktivitäten in den verschiedenen Organen.

Aus der Auswertung der LINEWEAVER-BURK-Diagramme[Abb. 4] geht hervor, daß sich die MAO-Aktivitäten der einzelnen Organe von einander unterscheiden. Tabelle II weist aus, daß die Leber die höchste Aktivität hat, gefolgt von Hirn, in dem nur eine

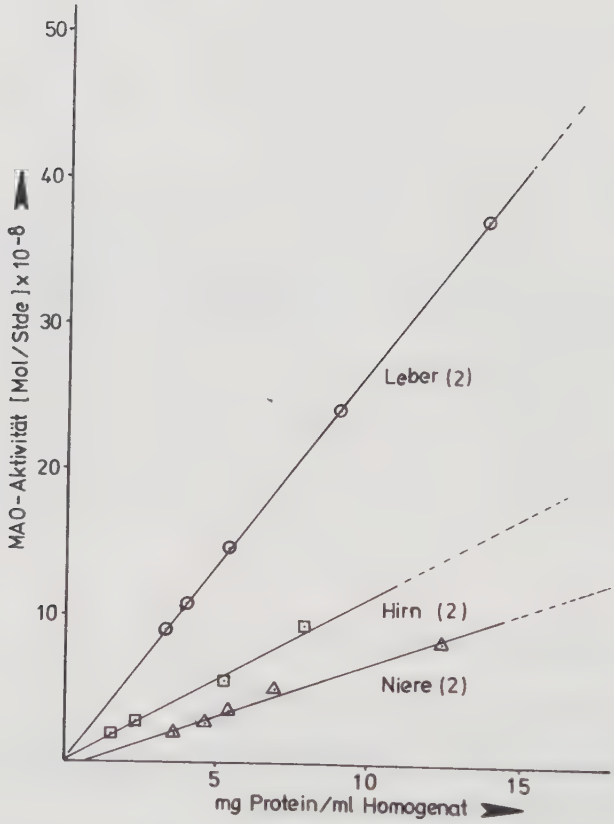


Abb. 2: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Proteinkonzentration.

Die MAO-Aktivität wurde nach McCAMAN et al.[29] nach 30 minutigen Inkubation von 10µl Homogenat mit 100µl [^{14}C] 5-HT bestimmt.

( ) = Zahl der Einzelversuche.

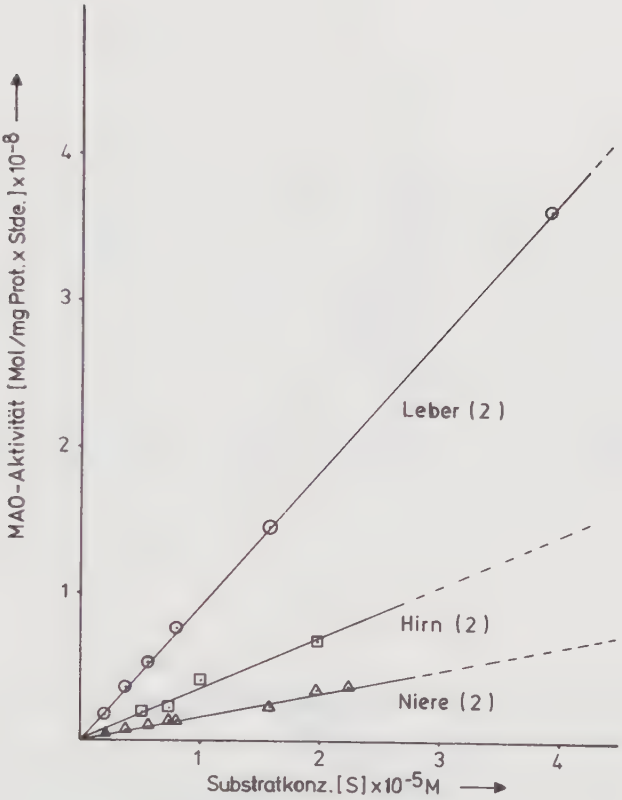


Abb. 3: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration.

Inkubationsbedingungen vergleiche Abb. 2!

ca. 1/2 mal so große Reaktionsgeschwindigkeit gefunden wurde. Die Niere als das Organ mit der niedrigsten MAO-Aktivität,

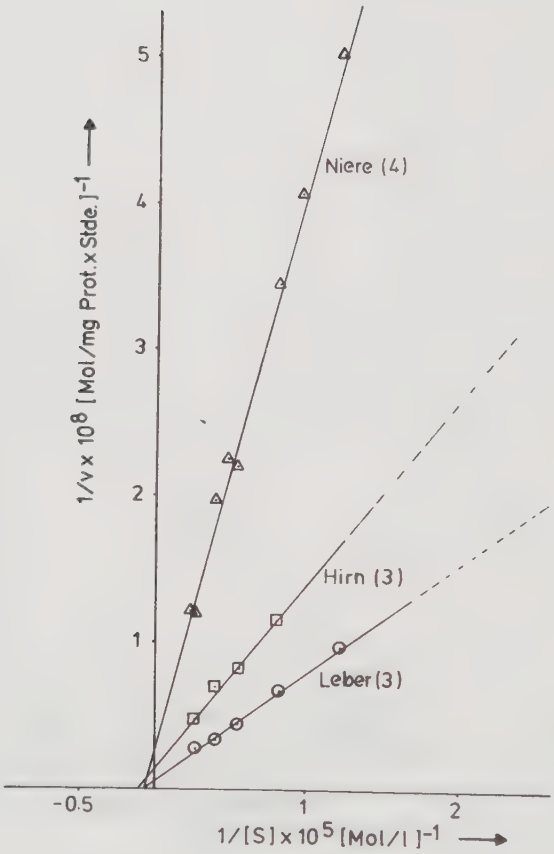


Abb. 4: Vergleich der MAO-Aktivitäten in den verschiedenen Organen.

Graphische Darstellung nach LINEWEAVER-BURK
Reaktionsgeschwindigkeit v [mol x 10^{-8}/mg Protein x Stunde].

Tabelle II: MAO-Aktivitäten der Organe: Vmax-Werte.

	Organ	Vmax ($x 10^{-8}$ mol/mg Prot. x Stde.)	n*	Student (t -) Test		
				Vergleich	Prüfgröße t	α **
1	Niere	2.57 ± 1.09	6	1 mit 2	3.26	0.99 %
2	Hirn	6.41 ± 2.42	6	1 mit 3	6.29	0.04 %
3	Leber	13.74 ± 3.84	5	2 mit 3	3.74	0.57 %

* Angegeben sind die Mittelwerte von n-Versuchen und die Standardabweichungen. Jeder Versuch wurde in 4 Parallelbestimmungen durchgeführt.

** α = Irrtumswahrscheinlichkeit.

hat etwas weniger als die Hälfte der Aktivität des Hirns. Die Vmax-Werte unterscheiden sich sehr($\alpha \leq 1\%$) bis hoch($\alpha \leq 0.1\%$) signifikant beim Vergleich der Organe untereinander. Hinsichtlich der Michaelis-Konstanten(Km) sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Der Student Test zeigt beim Vergleich der Km-Werte eine Prüfgröße t zwischen 0.52

Tabelle III: MAO-Aktivitäten der Organe: Km-Werte.

Organ		n	Km x 10^{-5} M	Student (t-) Test		
				Vergleich	Prüfgröße t	α
1	Niere	6	8.62 ± 3.29	1 mit 2	0.52	61.49
2	Hirn	6	9.60 ± 2.98	1 mit 3	0.99	35.49
3	Leber	5	10.66 ± 2.76	2 mit 3	0.56	58.77

Angaben wie in Tabelle II.

und 0.99, mit α zwischen 35.49% und 61.49% [Tabelle III], d.h. keine Signifikanz, für die $\alpha \leq 5\%$ sein sollte.

5) Hemmwirkung der 1-Aminoadamantane.

a) Typ der Hemmung:

Das LINEWEAVER-BURK-Diagram der Abb. 5 zeigt, daß D1 die MAO-Aktivität im Hirn nicht-kompetitiv hemmt. Den gleichen Hemmtyp zeigen alle untersuchten 1-Aminoadamantane sowohl in der Leber als auch im Hirn und in der Niere [Abb. 6, 7, 8].

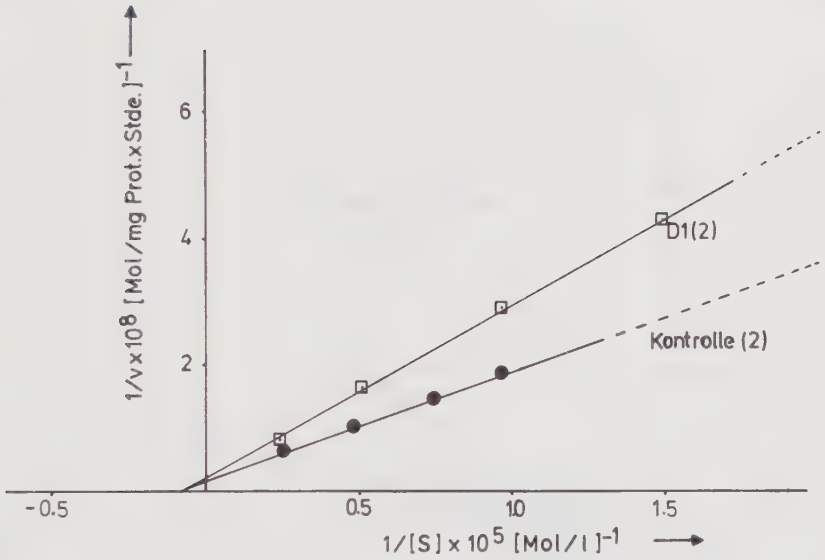


Abb. 5: Hemmung der MAO-Aktivität im Hirn der Ratte durch D1. Graphische Darstellung nach LINEWEAVER-BURK

b) Vergleich der Hemmstoffwirkung in den einzelnen Organen.

In Tabelle IV sind die Reaktionsgeschwindigkeiten (v-Werte) der MAO im Hirn, Leber und Niere nach Inkubation mit 10^{-3}M Lösungen der 1-Aminoadamantane (für D178 war die Konz. 2.5 x 10^{-4}M) mit denen der Kontrollen verglichen.

Die 1-Aminoadamantane zeigen zwar unterschiedliche starke Hemmung; die prozentuale Erniedrigung der MAO-Aktivität ist jedoch für alle Organe gleich: D1 42 - 47%, D145 83 - 85%, D191 91 - 96%, D178 90 - 94%.

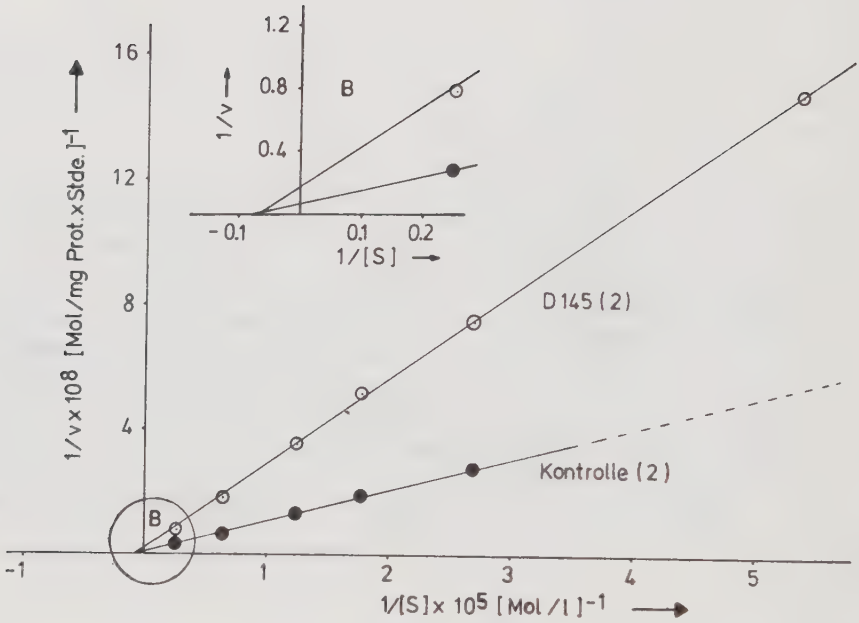


Abb. 6: Hemmung der MAO-Aktivität in der Leber der Ratte durch D145.

Angaben wie für Abb. 5.

c) Vergleich der Hemmstoffe untereinander.

Die K_I-Werte wurden nach DIXON [Abb. 9, 10, 11] und aus den LINEWEAVER-BURK-Diagrammen ermittelt.

Aus Tabelle V, die die K_I-Werte der 4 untersuchten 1-Amino-adamantane in den 3 Organen zusammenfaßt, geht hervor, daß sich die 3 K_I-Werte, die für einen bestimmten Hemmstoff jeweils in den drei Organen gefunden wurden, voneinander

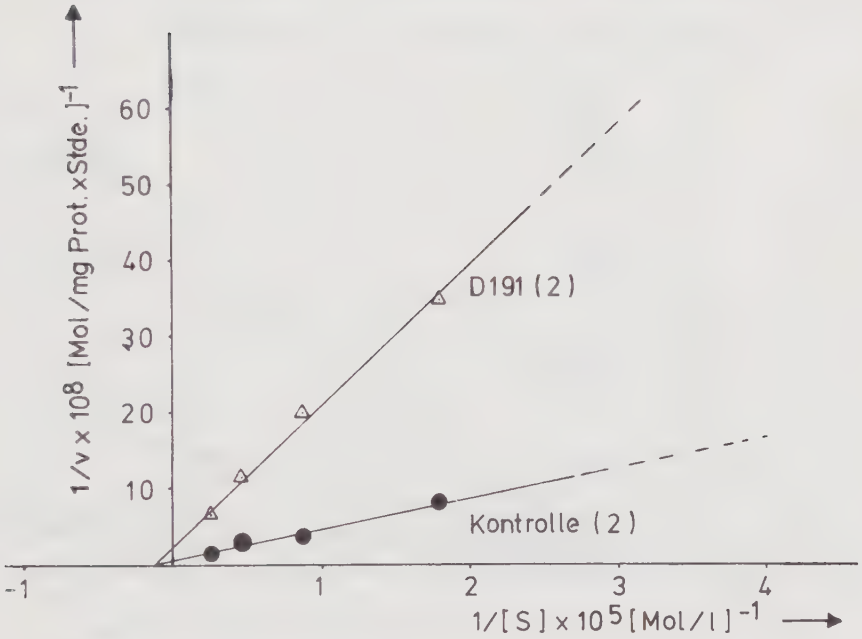


Abb. 7: Hemmung der MAO-Aktivität in der Niere der Ratte durch D191.

Angaben wie für Abb. 5.

nicht oder zumindest nicht signifikant unterscheiden.
So hat die Niere bei allen Hemmstoffen die niedrigsten K_I-Werte, doch sind die Unterschiede im Vergleich zu den anderen Organen nicht signifikant.
Für den schwächsten Hemmstoff, das D1, wurde in allen Organen die größte Dissoziationskonstante gefunden.

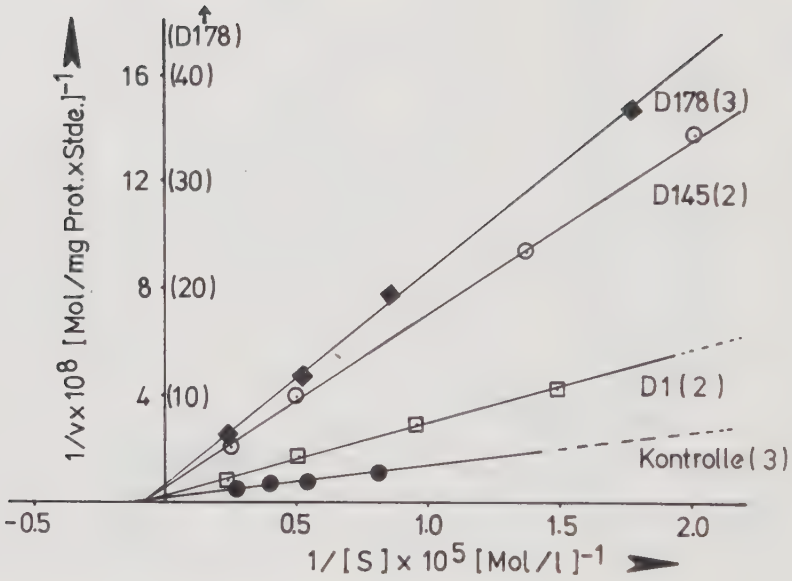


Abb. 8: Vergleich der Hemmwirkung von D1, D145, und D178 auf die MAO-Aktivität des Rattenhirns.
Darstellung nach LINEWEAVER-BURK.

Die Hemmstoffe selbst unterscheiden sich nicht nur, wie bereits unter Tabelle IV ausgeführt, in der %-Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit (v) sondern auch signifikant hinsichtlich der K_I-Werte.
Nur bei der Niere besteht für den Vergleich von D145 und D191 eine relativ hohe Irrtumswahrscheinlichkeit ($\alpha \leq 5\%$);

Tabelle IV: Vergleich der MAO-Aktivitäten der einzelnen Organen und ihre Hemmbarkeit durch 1-Amino-adamantane.

Organ	D 1			D 145			D 191			D 178 *		
	V_k	$V_{D\,1}$	%-H	V_k	$V_{D\,145}$	%-H	V_k	$V_{D\,191}$	%-H	V_k	V_{D178}	%-H
Niere	0.8196	0.4349	46.9	0.7976	-----	---	0.8800	0.0349	96.0	0.5267	0.0338	93.6
Hirn	1.8392	1.0155	44.8	2.3744	0.4143	82.6	2.1368	0.1645	92.3	1.6595	0.1746	89.5
Leber	2.9382	1.7063	41.9	3.5698	0.5445	84.7	3.6863	0.3300	91.0	3.4680	0.2871	91.7

v[x 10^{-8}mol/mg Protein x Stunde] = Reaktionsgeschwindigkeit.

V_k = Kontrolle; V_{D-} = inhibierte Reaktion.

%-H = prozentuale Hemmwirkung.

Hemmstoffkonzentration = 10^{-3}M, außer bei

*(D178) = 2.5 x 10^{-4}M.

Substratkonzentration lag zwischen 3.7 und 4.1 x 10^{-5}M 5-HT im Endvolumen von 110µl.

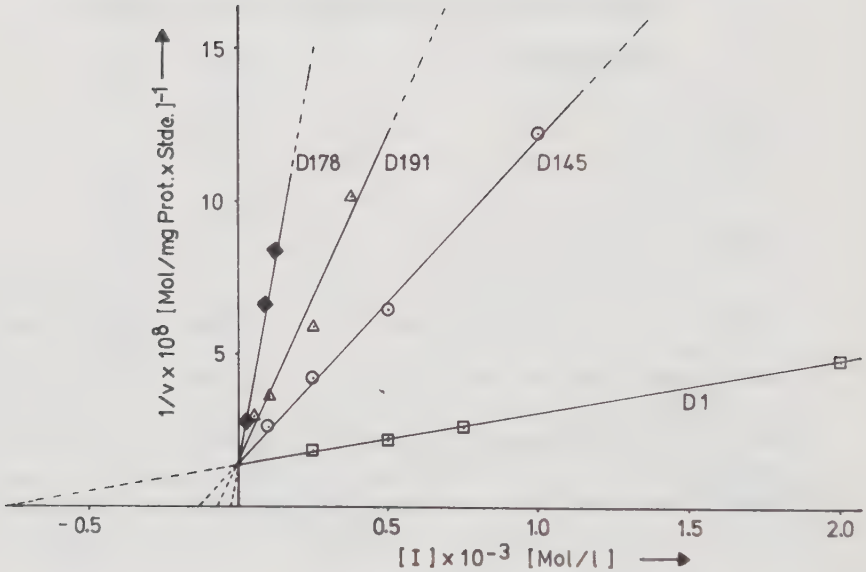


Abb. 9: Vergleich der Hemmwirkung von D1, D145, D191 und D178 auf die MAO-Aktivität der Rattenleber. Darstellung nach DIXON.

so daß die K_I-Werte in der Reihenfolge abnehmender Dissoziation des Inhibitor-Enzym-Komplexes, wie folgt, angeordnet werden können: D1 > D145 > D191 > D178.

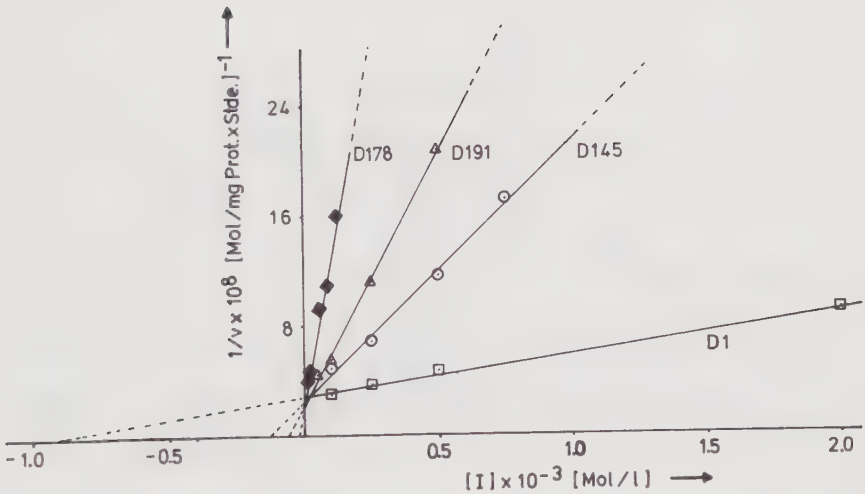


Abb. 10: Vergleich der Hemmwirkung von D1, D145, D191 und D178 auf die MAO-Aktivität des Rattenhirns.

Versuchsbedingungen wie für Abb. 9.

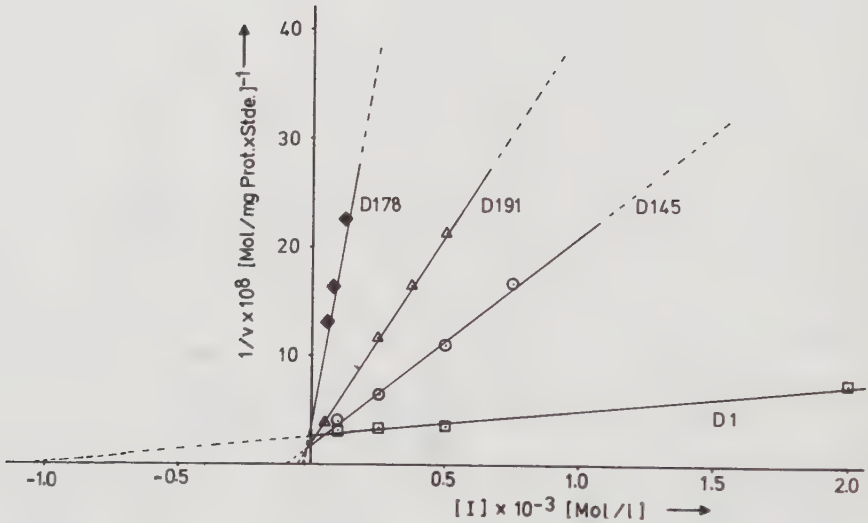


Abb. 11: Vergleich der Hemmwirkung von D1, D145, D191 und D178 auf die MAO-Aktivität der Rattenniere.

Darstellung nach DIXON. Angaben wie für Abb. 9.

Tabelle V: K_I-Werte* der 1-Aminoadamantane.

Hemmstoff	Niere ($\times 10^{-3}$ M)	Hirn ($\times 10^{-3}$ M)	Leber ($\times 10^{-3}$ M)
D 1	0.96 ± 0.22 (3)	1.37 ± 0.42 (4)	1.25 ± 0.18 (4)
D 145	0.082 ± 0.004 (2)	0.120 ± 0.01 (2)	0.125 ± 0.046 (3)
D 191	0.060 ± 0.01 (5)	0.060 ± 0.003 (3)	0.071 ± 0.003 (2)
D 178	0.017 ± 0.002 (3)	0.019 ± 0.008 (4)	0.024 ± 0.009 (4)

* Die K_I-Werte wurden den DIXON-Diagrammen entnommen bzw. aus den LINEWEAVER-BURK-Diagrammen errechnet. In Klammern ist die Anzahl der Versuche angegeben, aus denen die Mittelwerte von K_I berechnet wurden.

D. D I S K U S S I O N

1) Versuchstiere.

Es ist bekannt, daß die MAO-Aktivität sowohl vom Alter als auch vom Rattenstamm abhängt [21]. In den Versuchen wurde nur mit erwachsenen Wistar II Ratten, im Gewicht von 200 - 260g, gearbeitet.

Um den Einfluß des Menstrualzyklus auf die MAO-Aktivität [13,14] auszuschalten, wurden nur männliche Ratten benutzt. Die Steroide üben bekanntlich einen Einfluß auf die MAO-Aktivität [11,13,14] aus: Östrogene hemmen, Progesterone erhöhen die MAO-Aktivität.

Nach S. EIDUSON [22] hängen die MAO-Aktivität und die 5-HT Konzentration von der Tageszeit und der Temperatur ab. Alle Ratten wurden deshalb bei konstanten Temperatur und Luftfeuchtigkeit (21.5°C, 50 - 60% relative Luftfeuchtigkeit) gehalten, und zwischen 8 Uhr und 10 Uhr getötet.

2) Proteinbestimmung.

Die Methode nach LOWRY et al. [28] eignet sich gut für Mikrobestimmungen wie in diesem Fall; man kann sogar bis zu einem Empfindlichkeitsbereich von 0.2µg analysieren.

3) Zur Kinetik und Hemmung der MAO:

3.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substrat- und Proteinkonzentration.

Der Konzentrationsbereich des 5-HT für alle Versuche lag

zwischen 0.2 und 4.0 x 10^{-5}M (siehe Ergebnis 3). Bei Vorversuchen [Abb. 3] wurde in diesem Bereich für alle 3 Organe eine lineare Zunahme der MAO-Aktivität mit Erhöhung der Substratkonzentration, also eine Reaktion 1. Ordnung festgestellt.
Im untersuchten Konzentrationsbereich nahm die MAO-Aktivität mit Erhöhung der Proteinkonzentration linear zu.

3.2. MAO-Aktivitäten der Organe.

Die Isotopenmethode nach McCAMAN et al.[29] hat gegenüber fluorometrischen und anderen photometrischen Methoden, bei denen häufig strukturanaloge Substanzen (Tryptaminderivate) miterfaßt werden, den Vorteil hoher Spezifität durch Messung der Radioaktivität von 5-HT Metaboliten in den Äthylacetatextrakten.

Die Leber hatte die höchste Aktivität(V_{max}), gefolgt von Hirn, dann Niere.
HARADA et al.[23] bestimmten die MAO-Aktivitäten in einigen Hirnregionen. Berechnet man aus den von diesen Autoren angegebenen Daten die V_{max}-Werte in 10^{-8}Mol/mg Prot. x Stde., so erhält man Werte zwischen 7.8 und 12.0.
HAZAMA et al.[24] verglichen Hirnregionen(außer Cerebellum) von 2 und 12 Monate alten Ratten und fanden Werte für beide Gruppen zwischen 2 und 7.2 x 10^{-8}Mol/mg Prot. x Stde.
Die in der vorliegenden Arbeit gefundene MAO-Aktivität für Gesamthirn, Vmax = 6.41 x 10^{-8}Mol/mg Prot. xStde., stimmt mit diesen Literaturangaben recht gut überein.

Die Km-Werte für die 3 Organe sind nahezu identisch (8.6 bis 10.7 x 10^{-5}M).

Vergleicht man den in dieser Arbeit für die MAO der Leber gefundenem Km-Wert, 10.7 x 10^{-5}M mit den Angaben der Literatur, so fanden SUZUKI et al.[26] ein etwas niedrigere(Km = 13.5 x 10^{-5}M) und EKSTEDT [25] ein etwas höhere Affinität (Km = 6 x 10^{-5}M).

Während man also bei den Leberwerten eine nahezu vollkommene Übereinstimmung mit der Literatur feststellt, unterscheiden sich die in der eigenen Arbeit für Hirn und Niere erhaltenen Werte von 9.6 bzw. 8.6 x 10^{-5}M deutlich von den von SUZUKI et al.[26] publizierten Angaben - Hirn: 17.2, Niere: 52.6 x 10^{-5}M.

Eine Erklärung für diese, vor allem bei der Niere erhebliche Diskrepanz kann nicht gegeben werden. Allerdings führten SUZUKI et al.[26] die Inkubation bei pH 7.4 durch, während in dieser Arbeit der pH-Wert 8.3 betrug.

Außerdem sei erwähnt, daß in den ersten eigenen Versuchen zur Bestimmung der MAO-Aktivität höhere Km-Werte gefunden wurden, die wir auf einem unvollkommenen Gewebsaufschluß zurückführten.

Es ist bekannt, daß die MAO-Aktivität je nach Organ, Substrat und Spezies variert [5]. Ferner ist bekannt, daß die Substrate Noradrenalin, 5-HT und Normetanephrin bevorzugte Substrate der MAO "A" sind [6]. Dagegen ist ß-Phenyläthylamin(PEA) ein natürliches Substrat [1,26] und Benzylamin ein künstliches Substrat der MAO "B" [6,26]; während

Tryptamin, Tyramin und Dopamin(DA) von beiden Typen (MAO "A" und MAO "B") metabolisiert werden [6].

Die hohe Aktivität der Leber beruht wahrscheinlich auf dem Vorhandensein von hohen Aktivitäten der MAO "A". Die Leber von Ratte, Meerschweinchen und Mensch hat eine hohe MAO "A"-Aktivität [4]. Das Verhältnis A/B beträgt ca. 0.5.

Der Verdauungstrakt hat ebenfalls einen hohen A/B Wert.

Die höchsten Konzentrationen des Serotonins, das als bevorzugtes Substrat der MAO von Typ A gilt, werden in Darm gefunden.

Zwei Gründe kommen für die niedrige Aktivität der Niere in Frage: 1) die Niere ist das härteste der 3 Organe. Es ist möglich, daß beim Homogenisieren (siehe Methode) keine ausreichende Zerkleinerung des Gewebes erreicht wurde, so daß nicht alle in den Mitochondrien vorhandene Enzyme an der Reaktion teilnehmen konnten; 2) es liegt verhältnismässig weniger MAO "A" in der Niere als z.B. in der Leber oder Hirn vor.

WEST [43] und MARIANI und VALZELLI [44] geben die Werte für 5-HT (MAO "A" Substrat) der Rattenniere mit 0.1µg/g Frischgewicht und 0.44µg/g Feuchtgewicht an. Diese Werte sind deutlich niedriger als die von STACEY [42] angegebenen Werte für Hirn (außer Cerebellum) und Verdauungstrakt, so daß sie eine mögliche Erklärung für die niedrige Aktivität der Niere bieten.

Eine Substrathemmung als Ursache der niedrigen MAO-Aktivität der Niere ist auszuschließen, da in Vorversuchen (Ergebnis 3) gezeigt werden konnte, daß bei Erhöhung der Substratkonzen-

tration die MAO-Aktivität zunimmt.

4) Hemmung:

a) Hemmtyp.

Die Abb. 5, 6, 7 & 8 zeigen, daß die 1-Aminoadamantane die Umsetzung von 5-HT nicht-kompetitiv hemmen. Dies steht in Übereinstimmung mit den Arbeiten von HAACKE et al. [20] und HAACKE und WESEMANN [27] für D1 und D145.

b) Hemmwirkung in den einzelnen Organen.

Aus Tabelle IV ist zu ersehen, daß die 1-Aminoadamantane in jedem Organ etwa die gleiche Hemmwirkung zeigen.

c) Vergleich der Hemmstoffe untereinander.

Trotz der geringen Versuchszahl weisen Tabelle V und Abb. 9 - 11 darauf hin, daß für die untersuchten Organe - Leber, Niere, Hirn - und für das Substrat 5-HT die 1-Aminoadamantane in der Reihenfolge zunehmender Hemmwirkung, wie folgt, anzuordnen sind: D1- D145 - D191 -D178.
Der K_I-Wert für D145 aus der Arbeit von HAACKE und WESEMANN mit Thrombozyten [27] (1.5×10^{-4}M) stimmt mit den hier gefundenen Werten für Hirn bzw. Leber überein - 1.2 bzw. 1.3×10^{-4}M.

D1 und D145 sind in der Klinik zur Behandlung des M. Parkinson eingesetzt worden. Nach FISCHER et al. [30] sind beim Vergleich von D1 und D145 (die Autoren hatten für D1 Adamantanaminsulfat statt Adamantanamin.HCl im Versuch ein-

gesetzt) die Kurzzeiteffekte beider Substanzen sehr ähnlich, wobei D145 besser verträglich ist. Die Auswirkungen auf die motorischen Funktionen sind etwa gleich, während die Antriebswirkung bei D145 (Memantin) anscheinend etwas stärker ist.
CHASE [31] führt zwar die Antiparkinsoneffekte nach Parachlorphenylalanin nicht auf Wirkung auf den Serotoninstoffwechsel zurück, aber ŚMIAŁOWSKA [32] hat eine funktionelle Interaktion zwischen dopaminergen und serotonergen Neuronen in dem NDR (dorsal raphe nucleus) gefunden. Auch HORNYKIEWICZ [41] fand bei M. Parkinson eine 5-HT-Erniedrigung im ZNS.
D145 wirkt mit Sicherheit auf die 5-HT Neurone; der Mechanismus ist allerdings noch umstritten. J.MAJ [33] fand nach D145 eine Abnahme des 5-HT Spiegels und eine Zunahme des 5HIAA-Gehaltes im Rattenhirn. ŚMIALOWSKA [34] beobachtete in den Raphekernen des Rattenhirns eine Abnahme der 5-HT Fluorescenz nach Behandlung mit D145. In der Arbeit von WAND et al. [35] wird diskutiert, ob der Effekt von D145 durch 5-HT Ausschüttung aus den Neuronen und/oder durch direkte Stimulation der 5-HT-Rezeptoren zu erklären ist.

d) Beziehung zwischen Struktur der 1-Aminoadamantane und der Hemmwirkung

Wie ist die unterschiedliche Hemmwirkung der 1-Aminoadamantane zu erklären?
Ein Blick auf die Strukturen dieser Substanzen zeigt, daß die Hemmwirkung mit der Zahl bzw. der Länge der C-Alkylsub-

stituenten der 1-Aminoadamantane zunimmt. Im Vergleich zur Muttersubstanz, dem D1, hat D145 2 Methylgruppen, D191 3 Methylgruppen und D178 eine n-Butylgruppe.
Nach PARKS [19] hat D1, ein wasserlösliches Aminsalz, eine starke lipophile (hydrophobe) Natur; ferner soll D1 nach oraler Zufuhr bei vielen Spezies, wie auch bei der Ratte, völlig resorbiert werden [19]. Der Harn ist Hauptausscheidungsweg in allen untersuchten Spezies [19].
Vor kurzem haben WESEMANN et al. [36] in Untersuchungen an der Ratte festgestellt, daß nach oraler oder i.p. Aufnahme die Ausscheidung von D1 und seines 3-Hydroxyderivates rascher und vollständiger ist als die von D145. Überdies wird D145 anscheinend stärker als D1 metabolisiert. Sicher wurden im Rattenurin die Derivate: 1-hydroxy-3,5-dimethyl-, 3-Hydroxymethyl-5-methyl-, 4-Hydroxy-3,5-dimethyl- und 7-Hydroxy-3,5-dimethyladamantan nachgewiesen. Beim Menschen wurde bisher allerdings nur das 3-Hydroxymethylderivat identifiziert. Man kann daraus den Schluß ziehen, daß in vivo D145 stärker oder besser im Gewebe gebunden wird als D1.

Wie ist dann die In vitro-Wirkung dieser Hemmstoffe zu erklären? Die Stärke der Hemmung ist ohne Zweifel mit der C-Alkylsubstitution der Muttersubstanz (D1) in Zusammenhang zu bringen. Wie dies' im einzelnen zu deuten ist, geht aus den vorliegenden Versuchen nicht hervor.

Es ist bekannt, daß bei Monosubstitution des Adamantans die Kugelstruktur gestört wird. Zum Beispiel hat Adamantan einen Schmelzpunkt von 250°C, das Methyladamantan 102°C und

das Äthyladamantan ist bei Zimmertemperatur bereits flüssig. Vielleicht wird durch die Aufhebung der Kugelstruktur eine bessere Bindung des Enzyms an dem Hemmstoff ermöglicht; außerdem wird durch C-Alkylsubstitution die Basizität der 1-Aminoadamantane erhöht.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Durch in vitro-Versuche an den Organen Leber, Niere und Hirn von männlichen Wistar II Ratten wurde der Einfluß von 1-Aminoadamantan (D1) und einigen C-alkylierten Derivaten [D145 = 1-Amino-3,5-dimethyladamantan; D191 = 1-Amino-3,5,7-trimethyladamantan; D178 = 1-Amino-3-(n)-butyladamantan] auf die Aktivität der MAO untersucht.

Die MAO-Aktivität wurde nach McCAMAN et al. durch eine Radioisotopenmethode mit ^{14}C-markierten Serotonin als Substrat bestimmt.

In kinetischen Versuchen wurde die Abhängigkeit der MAO-Aktivität von der Proteinkonzentration und die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Kinetik überprüft und gesichert. Für die Leber wurde die höchste Aktivität (Vmax = 13.7 x 10^{-8}Mol/mg Protein x Stde.) gefunden. Das Hirn folgte mit Vmax: 6.41 x 10^{-8}Mol, dann Niere mit Vmax: 2.57 x 10^{-8}Mol/mg Protein x Stde. Die Km -Werte der drei Organe unterschieden sich nicht signifikant voneinander: Niere: 8.62, Hirn: 9.60, Leber: 10.66 x 10^{-5}M.

Alle untersuchten 1-Aminoadamantane hemmten die MAO-Aktivität von Hirn, Leber und Niere nicht-kompetitiv, wobei jedes 1-Aminoadamantanderivat in allen 3 Organen etwa die gleiche prozentuale Hemmung zeigte. Die Hemmwirkung nahm mit dem Grad der Alkylierung zu: D1 (1 Aminoadamantan: K_I = 0.96 - 1.36 x 10^{-3}M) < D145 (3,5-Dimethylderivat: K_I = 0.08 - 0.13 x 10^{-3}M) < D191 (3,5,7-Trimethylderivat: K_I = 0.06 - 0.07 x 10^{-3}M) < D178 (3-n-Butylderivat: K_I = 0.017 - 0.024 x 10^{-3}M).

F. S U M M A R Y

The Mode of Action of 1-Aminoadamantanes - Effect on the MAO-activity of rat brain, liver and kidney.

In in vitro experiments on liver, kidney and brain of male Wistar II rats, the effect of 1-aminoadamantane (D1) and some of its C-alkylderivatives [D145 =1-amino-3,5-dimethyladamantane; D191 = 1-amino-3,5,7-trimethyladamantane; D178 = 1-amino-3-(n)- trimethyladamantane] was studied.

The MAO-activity was determined with a radioisotope methode with ^{14}C-marked serotonin as substrate according to McCAMAN et al. In kinetic studies the increase of MAO-activity with rise in protein concentration, and the validity of the kinetics of Michaelis-Menten were checked and certified.

The liver had the highest activity (Vmax: 13.7 x 10^{-8}mol/mg protein per hr.). Brain followed with Vmax: 6.41 x 10^{-8} mol, and lastly kidney with Vmax: 2.57 x 10^{-8}mol/mg prot. per hr. There were no significant differences in the Km-values of the three organs: kidney: 8.62; brain: 9.60; liver: 10.66 x 10^{-5}M. All studied 1-aminoadanmantanes showed a non-competitive inhibition of the MAO-activity in brain, liver and kidney, each derivative respectively showing in all three organs about the same percentage inhibition.

The strength of inhibition was found to increase with the degree of alkyl substitution: D1 (1-aminoadanmantane: K_I= 0.96 - 1.36 x 10^{-3}M) < D145 (3,5,-dimethylderivative: K_I= 0.08 - 0.13 x 10^{-3}M) < D191 (3,5,7-trimethylderivative: K_I= 0.06 - 0.07 x 10^{-3}M) < D178 (3-n-butylderivative: K_I = 0.017 - 0.024 x 10^{-3}M).

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

[1] YOUDIM M. B. H., M. HOLZBAUER: Physiological and pathological changes in Tissue MAO-activivity.
Journal of Neural Transmission 38, 193 - 229 (1976)

[2] YOUDIM, COLLINS, SANDLER, BEVAN J., PARE and NICHOLSON: Human brain MAO: Multiple forms and selective inhibitors.
Nature, 236: 225 - 228 (1972)

[3] COLLINS, YOUDIM and SANDLER: Multiple forms of MAO: Comparison of in vitro and in vivo inhibition patterns.
Biochemical Pharmacology, 21: 1995 - 1998 (1972)

[4] SQUIRES,R.F.: Monoamine Oxidases - New Vistas - Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 355 - 370 (1972)

[5] DIAZ BORGES,J.M., D'IORIO,A.: Multiple forms of mitochondrial Monoamine Oxidase.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 79 - 89 (1972)

[6] NEFF,N.H., GORIDIS,C.: Neuronal MAO: Specific enzyme types and their rates of formation.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 307 - 323 (1972)

[7] YOUDIM, M. B. H.: Multiple forms of MAO and their Properties.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 67 - 77 (1972)

[8] TIPTON, K. F.: Some properties of Monoamine Oxidase.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 11 - 24 (1972)

[9] ROSS, B. D.: In: Perfusion Techniques in Biochemistry.
Clarendon Press, Oxford, p. 4 (1972)

[10] SCHAITMAN, ERWIN and GREENAWALT: Submitochondrial localisation of MAO.
Journal of Cell Biology, 34: 719 - 735 (1967)

[11] YOUDIM, M.B.H., HOLZBAUER, M., WOODS, H.F.: Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 12, 11 - 28 (1974)
Physicochemical Properties, Development, and Regulation of Central and Peripheral MAO-activity.

[12] GROSSO, D.S., GAWIENOWSKI, A.M.: Modification of rat uterine MAO-activity by steroid hormones.
Journal of Endocrinology 65, 207 - 214 (1975)

[13] COLLINS, PRYSE-DAVIES, SANDLER and SOUTHGATE:
Nature, 226: 642 - 643 (1970)

[14] HOLZBAUER, M., YOUDIM, M.B.H.: Monoamine Oxidase and oestrous cycle.
British Journal of Pharmacology, 48: 600 - 608 (1973)

[15] GRIPOIS, D.: Review - Developmental characteristics of Monoamine Oxidase.
Comparative Biochemistry and Physiology, Vol. 51C, pp. 143 - 151 (1975)

[16] WURTMAN, R.J., FERNSTROM, J.D.: Control of brain Monoamine synthesis by diet and plasma amino acids.
American Journal of Clinical Nutrition 28: 638 - 647 (1975)

[17] GANONG, W.F.: Lehrbuch der medizinischen Physiologie, 3. Auflage (1974) S.216 ff.

[18] PARE, C.M.B.: Clinical implications of Monoamine Oxidase Inhibition.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 441 - 444 (1972)

[19] PARKES, David: Amantadin.
Advances in Drug Research, Vol. 8, 11 - 81 (1974)
(Academic Press - London-New York-San Francisco)

[20] HAACKE, U., STURM, G., SÜVER, V., WESEMANN, W., WILDENHAHN, G.: Zur Wirkung der 1-Aminoadamantane.

Arzneim.-Forsch./Drug Research 27(II), Nr. 7 (1977) 1481 - 1483.

[21] BLATFORD, D., HOLZBAUER, M., GRAHAME-SMITH, D.G., and YOUDIM, M.B.H.: Ontogenesis of Enzyme Systems deaminating different Monoamines.
British J. of Pharmacol. 57, 279 - 293 (1976)

[22] EIDUSON, Samuel: Ontogenetic Development of MAO.
Advances in Biochemical Psychopharmacology Vol. 5, 271 - 287 (1972)

[23] HARADA, M., KONDO, Y., KUZUYA, H., NAGATSU, T.: Monoamine Oxidase Activities towards biogenic monoamines in several regions of rat brain.
J. of Neurochemistry 24, 193 - 195 (1975)

[24] HAZAMA, H., ITO, M., HIRANO, M., UCHIMURA, H.: Short Communication. Monoamine Oxidase activities in neuronal and glial fractions from regional areas of rat brain.
Journal of Neurochem. Vol. 26, 417 - 419 (1976)

[25] EKSTEDT, B.: Substrate specificity of the different forms of Monoamine Oxidase in rat liver mitochondria.
Biochemical Pharmacology, Vol.25, 1133 - 1138 (1976)

[26] SUZUKI, O., NOGUCHI, E., YAGI, K.: A simple fluorometric Assay for Type B Monoamine Oxidase Activity in Rat Tissues.

J. Biochem. (Tokyo), 79, 1297 - 1299 (June 1976)

[27] HAACKE, U., WESEMANN, W.: Induction of the Platelet Release Reaction by 1.3.-Dimethyl-5-aminoadamantane, a new Adamantane Derivative.
Thrombosis and Haemostasis Nr. 1 Vol. 37 (Feb. 1977)

[28] LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

[29] McCAMAN, R.E., McCAMAN, M.W., HUNT, J.M., SMITH, M.S.: Microdetermination of Monoamine Oxidase and 5-OH-tryptophane Decarboxylase Activities in Nervous Tissues.
Journal of Neurochem., Vol. 12, 15 - 23 (1965)

[30] FISCHER, P.-A., JACOBI, P., SCHNEIDER, E., SCHÖNBERGER, B.: Die Wirkung intravenöser Gaben von Memantin bei Parkinson - kranken.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27(II), Nr. 7 (1977)
1487 - 1489.

[31] CHASE, T.N.: Serotonergic Mechanisms in Parkinson's disease.
Arch. Neurol. Vol. 27, 354 - 356 (1972)

[32] SMIALOWSKA, M.: Histofluorescence studies on the effect of D145 on serotonin neurons in midbrain in raphe nuclei.
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 28, 233 - 242 (1976)

[33] MAJ, J.: Pol. J. Pharmacol. Pharm. Suppl. to Vol. 27, 45 - 46 (1975)

[34] SMIALOWSKA, M.: The influence of D145 on catecholaminergic neurons of the rat brain.
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 28, 259 - 267 (1976)

[35] WAND, P., SONTAG, K.-H., CREMER, H.: Effects of 1,3-Dimethyl-5-aminoadamantane Hydrochloride (DMAA) on the Stretch-induced Reflex Tension of Flexor Muscles and the Excitability of the y-Loop in Decerebrate and Spinal Cats.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27(II), Nr.7, 1477 - 1481 (July 1977)

[36] WESEMANN, W., SCHOLLMEYER, J.D., STURM, G.: Gaschromatographische und massenspektrometrische Untersuchungen über harnpflichtige Metabolite von Adamantanaminen.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 27(II), Nr. 7, 1471 - 1477 (July 1977)

[37] YOUDIM, M.B.H., WOODS, F.: Commentary. The Influence of Tissue Environment on the Rates of metabolic Processes and the properties of enzymes.
Biochemical Pharmacology Vol. 24, 317 - 323 (1975)

[38] SHIMADA, S., KIMURA, M., INAGAKI, C., FUJITA, Y., TANAKA, C.: Effect of amantadine on serotonin metabolism in rat brain.
Folia pharmacol. japon, 69, 801 - 809 (1973)

[39] HADORN, W., STUCKI, P.: Lehrbuch der Therapie, 6. Auflage (Bern, Stuttgart, Wien): Huber (1977) S. 670 - 672

[40] BARTLEY, W., BIRT, M., BANKS, P.: The Biochemistry of the Tissues. Eine Einführung für Mediziner (S. 3) Verlag Chemie 1970 / Weinheim.

[41] HORNYKIEWICZ, O.: in: Handbook of Neurochemistry, Vol. VII (Ed. A. Lajtha), p. 473, Plenum Press, New York - London (1972)

[42] STACEY, R.S.: Clinical aspects of cerebral and extracerebral 5-HT.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie
Handbook of Experimental Pharmacology, Edited by O. Eichler (Heidelberg), A. Farah (Syracuse, N.Y.)
Vol. XIX: 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines. Springer Verlag (Berlin, Heidelberg, New York) 1966 (S. 744 ff.).

[43] WEST, G.B.: J. Pharm. and Pharmacol. 10, 92T (1958)

[44] MARIANI, L., VALZELLI , L.: Boll. soc. ital. biol. sper. 34, 1167 (1958).

[45] BUDDECKE, E.: Pathobiochemie, 2. Auflage, 1978 Walter de Gruyter - Berlin. New York (S. 181).

Lebenslauf

Am 12.08.1949 wurde ich als zweites Kind des Geschäftsmannes Onuoha Ekenna und seiner Ehefrau, der Lehrerin Urasi, geb. Ezurike in Aba-Nigeria geboren.

Die Volksschulausbildung absolvierte ich von 1955 -1962 an der Government Primary School Aba. Anschließend besuchte ich das Gymnasium - Dennis Memorial Grammar School - in Onitsha.

Eine kurze Unterbrechung für ein Jahr (1965/66) diente einen Aufenthalt in Loughborough -England als Austauschschüler. Eine weitere Unterbrechung des Gymnasialbesuches war unumgänglich (1967 - 1969) als bei uns im Lande Krieg herrschte.

Das Abitur (G.C.E.- A-Levels) legte ich dann an dem Modern Tutorial College in London ab (Okt. 1970 - Juni 1971).

Ab Oktober 1971 studierte ich an der Goethe Universität Frankfurt für 2 Semester Mineralogie.

Seit Okt. 1972 studiere ich Medizin an der Philipps-Universität in Marburg. Zur Zeit absolviere ich das praktische Jahr.

Okechukwu Ekenna

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer in Marburg:

Amon, Arndt, Baltzer, Bode, Braasch, Buchholz, Castenholz, Daume, Dennhardt, Dittrich, Dombrowski, Doss, Egbring, Ehrhardt, Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich, Gallwitz, Ganz, Gerdes, Golenhofen, Goßmann, Graul, Grundner, Haberich, Habermehl, Hamelmann, Hardewig, Havemann, Heene, Hensel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Jakob, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Kessler, Klaus, Klein, Kleine, Kleinsasser, Knauff, Koch, Koranski, Knoll, Kuni, Lange, Lauer, Lehmann F-G., Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mannheim, Maroske, Martini, Massarrat, Müller Kh., Neirath, Niemeyer, Oepen I., Petry, Pohlen, Portig, Pots, Priebe, Riecken, Rodeck, Rohen, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schmidt M., Schmitz-Moormann, Schneider, Schulte-Hermann, Schwick, Seifart, Sekerist, Siegert, Siegrist, Slenczka, Sodomann, Solcher, Straub, Sturm, Stutte, Weber, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Wiegandt, Willenbockel.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. W. Wesemann für die Überlassung des Themas und den großzügigen Rat und die Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit.
Bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Stachorra, der freundlicherweise die Abbildungen angefertigt hat;
bei Herrn Block - von der Tierhaltung - für seine Hilfe zum Überwinden der anfänglichen Unsicherheiten und Ängste in Umgang mit den Ratten;
sowie den Mitarbeitern des Labors Wesemann für die freundliche Arbeitsatmosphäre.